

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Kateřina Comová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**PREANALYTICKÉ VLIVY CYTOLOGICKÉHO
VYŠETŘENÍ MOZKOMÍŠNÍHO MOKU**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Brož

PLZEŇ 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne

vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji MUDr. Pavlu Brožovi za vstřícný přístup, odborné vedení práce, poskytování cenných rad a materiálních podkladů.

Anotace

Příjmení a jméno: Comová Kateřina

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Preanalytické vlivy cytologického vyšetření mozkomíšního moku

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Brož

Počet stran – číslované: 36

Počet stran – nečíslované: 15

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 27

Klíčová slova: Mozkomíšní mok, likvor, buněčné elementy, Fuchs–Rosenthalova komůrka

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá změnami v počtech erytrocytů, polynukleárů a mononukleárů v likvoru v závislosti na čase. Práce je rozdělena na dvě části – teoretickou a praktickou. Teoretická část je zaměřena na popis obecných charakteristik likvoru. Dále je zde zmíněn odběr, indikace k vyšetření, popis fyzikálního, biochemického a cytologického vyšetření, rozdělení nálezů dle syndromologické klasifikace a popis preanalytické fáze laboratorního vyšetření. Praktická část je zaměřena na počítání buněčných elementů ve Fuchs–Rosenthalově komůrce s následným vyhodnocením výsledku. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce u každého vzorku. Pro zpracování této práce byla použita odborná literatura. Tato práce může sloužit jako podklad pro další výzkum.

Annotation

Surname and name: Kateřina Comová

Department: Department of Theoretical Fields

Title of thesis: Preanalytical influences on the cytological examination of cerebrospinal fluid

Consultant: MUDr. Pavel Brož

Number of pages – numbered: 36

Number of pages – unnumbered: 15

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 26

Key words: Cerebrospinal fluid, cellular elements , Fuchs-Rosenthal counting

Summary:

This thesis examines the changes in erythrocyte, polynuclear and mononuclear cell count in cerebrospinal fluid after delayed analysis. The content of the thesis is divided into a theoretical part and a practical part. The theoretical part focuses on the description of the general characteristics of cerebrospinal fluid. Additionally, it also mentions the collection of the fluid, indications of cerebrospinal fluid examination, description of physical, biochemical and cytological parameters, categorization of the findings according to the syndromologic classification and a description of the preanalytical phase in the laboratory. The main focus of the practical part is on the counting of the cellular elements in a Fuchs-Rosenthal counting chamber, with a subsequent evaluation of the results. Results are presented in a table by each sample. Scientific literature was used in the preparation of the thesis. The result of this study may serve for further research.

OBSAH

1	CHARAKTERISTIKY MOZKOMÍŠNÍHO MOKU	11
1.1	Anatomie	11
1.2	Vznik, cirkulace a resorpce likvoru.....	11
1.3	Bariéry	12
1.4	Funkce likvoru.....	12
2	ODBĚR, INDIKACE K VYŠETŘENÍ MOZKOMÍŠNÍHO MOKU	14
2.1	Odběr	14
2.2	Indikace vyšetření likvoru	14
2.2.1	Vybraná zánětlivá onemocnění CNS	15
2.2.1.1	Purulentní meningitida	15
2.2.1.2	Virové infekce	15
3	VYŠETŘENÍ MOZKOMÍŠNÍHO MOKU	17
3.1	Tlak v likvorových cestách.....	17
3.2	Vzhled.....	17
3.3	Biochemické vyšetření likvoru.....	18
3.3.1	Proteinorachie	18
3.3.2	Glykorachie	18
3.3.3	Laktát.....	19
3.3.4	Chloridy.....	19
3.3.5	Ostatní biochemická vyšetření	19
3.3.5.1	Spektrofotometrie.....	19
3.3.5.2	Elektroforéza	19
3.3.5.3	Izoelektrická fokusace bílkovin.....	20
3.4	Cytologické vyšetření likvoru	20
3.4.1	Cytologie kvantitativní.....	20
3.4.1.1	Vyjadřování počtu elementů	20

3.4.2	Cytologie kvalitativní.....	20
4	CYTOLOGICKÉ NÁLEZY V MOZKOMÍŠNÍM MOKU	22
4.1	Fyziologický nález.....	22
4.2	Patologický nález.....	22
4.2.1	Syndromologická klasifikace likvorových cytologických nálezů.....	22
4.2.1.1	Oligocytóza	22
4.2.1.2	Pleocytóza	23
5	PREANALYTICKÁ ČÁST LABORATORNÍHO VYŠETŘENÍ.....	25
5.1	Odběr materiálu	25
5.2	Transport materiálu	25
5.3	Preanalytická fáze v laboratoři	26
5.4	Požadavky ke zpracování	26
6	CÍL A HYPOTÉZY	27
6.1	Cíl	27
6.2	Hypotézy.....	27
7	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A POMŮCKY	28
7.1	Binokulární mikroskop Olympus BX41.....	28
7.2	Pipety a špičky.....	29
7.3	Fuchs–Rosenthalova komůrka.....	29
7.4	Barvicí roztok	29
8	PRACOVNÍ POSTUP	31
8.1	Vlastní počítání ve Fuchs–Rosenthalově komůrce.....	31
9	SLEDOVANÉ BUNĚČNÉ SPEKTRUM	33
10	SOUBOR PACIENTSKÝCH VZORKŮ	35
10.1	Cytologické nálezy a kazuistiky	35
	DISKUZE.....	42
	ZÁVĚR	44

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46
Knižní zdroje:.....	46
Internetové zdroje:	47
SEZNAM OBRÁZKŮ	49
SEZNAM TABULEK.....	50
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51

ÚVOD

Téma "Preanalytické vlivy cytologického vyšetření mozkomíšního moku" jsem si vybrala především proto, že vyšetření mozkomíšního moku je v populaci méně známé a přitom stejně důležité jako vyšetření krve a moči.

Vyšetření mozkomíšního moku cytologicky a biochemicky patří mezi základní vyšetřovací metody při podezření na některá neurologická onemocnění, jako je zánět mozku a míchy, krvácení do centrálního nervového systému (dále jen CNS), nádorové onemocnění a v neposlední řadě autoimunitní a degenerativní onemocnění nervového systému.

Pro vydání správného laboratorního výsledku je nutné dodržet bezchybný pracovní postup ve všech třech fázích laboratorního vyšetření – preanalytické, analytické a postanalytické. Cytologické vyšetření likvoru by mělo být zahájeno ideálně do hodiny, maximálně do dvou. Pokud se tak nestane, hrozí, že ve vyšetřovaném vzorku nastane rozpad přítomných buněčných elementů a dojde ke zkreslení výsledku (falešné snížení). Ve své práci porušuji tento hodinový interval, což je pravděpodobně nejčastější preanalytická chyba v praxi.

Cílem bakalářské práce je zjištění, zda dojde ke snížení počtu buněčných elementů při cytologické analýze mozkomíšního moku po porušení správné preanalytické fáze laboratorního stanovení.

Tato bakalářská práce je rozdělena na dvě části – teoretickou a praktickou. V teoretické části jsou popsány společně se základními informacemi o likvoru i specifitější oblasti této problematiky, jako je například syndromologická klasifikace cytologických nálezů. V praktické části se zabývám instrumentálním zařízením, které je potřebné pro cytologické vyšetření. Dále se věnuji samotnému počítání buněčných elementů s vyhodnocením výsledku.

TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKY MOZKOMÍŠNÍHO MOKU

Mozkomíšní mok – likvor je u dospělého člověka čirá, bezbarvá tekutina. Přibližně do 3 měsíců věku je žlutý (xantochromní). Je hypoosmotický, isoosmolární a řadí se mezi transcelulární tekutiny. Je málo buněčný a kvalitativním složením se podobá plazmě. Liší se pouze kvantitativním složením – jsou odlišné koncentrace iontů (nižší koncentrace draslíku, vápníku, anorganických fosfátů a bikarbonátů a oproti tomu vyšší koncentrace sodíku, hořčíku a chloridů), obsahuje přibližně 200krát méně bílkovin. Likvor vyplňuje intracerebrální neboli intraventrikulární a extracerebrální neboli subarachnoidální prostor v poměru 1 : 4. (18, 23, 12, 15)

1.1 Anatomie

Mozek a mícha jsou kryty třemi membránami. Tyto membrány jsou z pojivové tkáně a jejich funkce spočívá v ochraně CNS, cév, které tento systém zásobují a v shromažďování likvoru. Zevní membrána se nazývá dura mater – tvrdá plena, vnitřní membrána se nazývá pia mater – měkká plena, která je průhledná a obsahuje cévy. Mezi tvrdou a měkkou plenou se nachází arachnoidea – pavučnice, která je bezcévná a volně přiléhá k tvrdé pleni. Likvor je přítomen v subarachnoideálním prostoru. (7, 15)

1.2 Vznik, cirkulace a resorpce likvoru

Větší část likvoru vzniká aktivní sekrecí choroidálních plexů (plexy jsou tvořeny záhyby měkké pleny mozkové) a ependymálních buněk jednotlivých komor mozku. Zbytek se tvoří ultrafiltrací krevní plazmy přes choroidální kapiláry. (7, 20)

Z postranních komor se posouvá do třetí komory mozku přes foramina Monroi. Do čtvrté komory přitéká přes aquaeductus Sylvii a z ní pak odtéká do subarachnoideálního prostoru nepárovým foramen Magendii a párovými foramina Luschkae. Ze čtvrté komory se část likvoru dostává do centrálního kanálu míchy. (7, 20)

Mezi vznikem a resorpcí likvoru je za fyziologických podmínek ustanovena rovnováha. U dospělého člověka je objem likvoru 120–180 ml a stále se obměňuje

(přibližně čtyřikrát za den). Za 24 hodin tedy vznikne 500–600 ml likvoru. (7, 20, 21, 25)

Do žilní cirkulace se likvor resorbuje přes výběžky arachnoidey, které zasahují až do nitrolebečních žilních splavů. Z menší části se resorbuje do lymfatického systému. (7, 20)

Při poruše cirkulace či resorpce, kdy se likvor hromadí v komorovém systému, vzniká vnitřní hydrocefalus. Vnější hydrocefalus vzniká v případě, kdy se hromadí v subarachnoideálním prostoru. (7, 20, 21, 25)

1.3 Bariéry

Bariéry, které regulují a zajišťují látkovou výměnu mezi krví, nervovou tkání a mozkem, jsou tři.

První je **hematoencefalická** bariéra (BBB), která tvoří přechod mezi krevními kapilárami a mozkovou tkání. Je složená z vrstvy endotelu mozkových kapilár (endotel je spojen pomocí těsných spojení - tight junction), bazální membrány a vrstvy astrocytů. Prostup makromolekul do mozkové tkáně znemožňuje právě tato bariéra. (21, 23, 15)

Druhá bariéra se nazývá **encefalolikvorová** – tvoří ji gliová vlákna na povrchu mozkové tkáně a ependymové buňky komor. Molekuly o velikosti bílkovin mohou prostupovat oběma směry. (21, 23, 15)

Bariéra, která odděluje krev a likvor, se nazývá **hematolikvorová**. Tvoří ji epitel choroidálních plexů a kapiláry pia mater. Pomocí specifických přenašečů nebo prostřednictvím pinocytózy je umožněn přestup proteinů z plazmy do likvoru. (21, 23, 15)

Další bariéry jsou enzymatické, které zabraňují prostupu látek do mozku tím, že rozkládají nebo degradují například neurotransmitery. Jsou lokalizovány ve stěně mozkových cév. (12, 21)

1.4 Funkce likvoru

Mezi tři hlavní funkce likvoru patří udržování homeostázy, odlehčení mozku a tlumení nárazů. Reálná hmotnost mozku, která je kolem 1500 g, klesne téměř na

ekvivalent 25 g v důsledku toho, že je mozek v podstatě ponořen v likvoru. Likvor chrání mozek do jisté míry před prudkými změnami vnějšího prostředí, jako jsou otřesy a nárazy, nebo změny teploty či tlaku.

Částečně zabezpečuje přívod živin a odvod vzniklých metabolitů. (12, 13)

2 ODBĚR, INDIKACE K VYŠETŘENÍ MOZKOMÍŠNÍHO MOKU

2.1 Odběr

Nejčastější způsob, kterým se likvor získává, je lumbální punkce. Lumbální punkce se provádí tak, že jehla pronikne kůží, podkožím, ligamentum supraspinale, ligamentum flavum, epidurálním prostorem, který obsahuje žilní pletěň, tvrdou plenou, na kterou bezprostředně naléhá arachnoidea a subarachnoideálním prostorem. Flexe páteře, během které se oblouky obratlů od sebe oddalují, napomáhá průniku jehly při punkci. Výkon se provádí v prostoru mezi obratli L₄ – L₅, či ještě lépe L₅ – S. (9, 13)

Další možností je punkce subokcipitální nebo ventrikulární. (12)

Při odběru se posuzuje také vzhled, tlak, pod jakým likvor vytéká, a průchodnost likvorových cest.

K vyšetření likvoru se obvykle u dospělého odebírá 10–15 ml, u dětí se odebírají cca 2 ml. Při léčebné punkci, kdy je farmakum aplikováno do likvorových cest, se odebírá takové množství, aby se tlak v likvorových cestách normalizoval. Po odběru je třeba doručit likvor do laboratoře co nejrychleji. Cytologické a biochemické vyšetření by mělo proběhnout do jedné, maximálně do dvou hodin od odběru. (1, 9, 15, 25)

2.2 Indikace vyšetření likvoru

Důvodem indikace lumbální punkce může být akutní stav i chronické onemocnění. Hlavní význam má její provádění při podezření na neuroinfekci. Je nezbytná nejen u podezření na meningitidu, ale rovněž u jinak nejasných febrilních stavů, zvláště u dětí.

Dále se vyšetření indikuje u zánětlivě - autoimunitních demyelinizačních onemocnění (např. roztroušená skleróza), systémových autoimunitních onemocnění (např. vaskulitidy), cévních mozkových příhod (ischemické a hemoragické ikty), traumat, degenerativních onemocnění (např. Alzheimerova choroba), či podezření na nádorová onemocnění (primární i sekundární). Patologický nález se může vyskytovat i u sekundárních onemocnění CNS, např. při dekompenzaci diabetes mellitus, hypothyreóze, alkoholismu, aj. (9, 12)

2.2.1 Vybraná zánětlivá onemocnění CNS

Neuroinfekce zahrnují záněty:

- mozkomíšních plen – meningitidy
- mozku – encefalitidy
- míchy – myelitidy
- kombinace zánětů

Společně se zánětem, či kombinací zánětů (např. encefalomyelitida), zde může být i postižení periferních nervů – neuritidy nebo nervových kořenů – radikulitidy. (2, 3)

Bakterie obvykle způsobují pyogenní infekce. Mezi další původce zánětu patří viry (které způsobují serózní záněty), plísně a houby. (2, 3)

2.2.1.1 Purulentní meningitida

Jde o akutní, život ohrožující infekci subarachnoideálních prostor měkkých plen. Původci onemocnění se liší v závislosti na věku pacienta. Většinou však jde o *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*. Rizikové skupiny jsou především děti, staří nebo imunosuprimovaní lidé a alkoholici. (19, 15)

Onemocnění se projevuje zpočátku bolestmi hlavy, zvracením, vysokou teplotou (40°C) a během hodin se rozvíjí porucha vědomí, případně epileptické záchvaty. Obvykle se rozvíjí meningeální syndrom, který se projevuje ztuhlostí šíje - pacient není schopen se dotknout bradou sternu. Na kůži vznikají specifické krvácivé projevy. (3)

Diagnózu potvrdí vyšetření likvoru, který vytéká pod zvýšeným tlakem a je zakalený. V cytologickém nálezu převažují polynukleáry (neutrofilní granulocyty) v řádech desetitisíců a biochemické vyšetření prokáže vyšší koncentraci bílkoviny společně se sníženou hladinou glukózy. Léčba spočívá v podávání vysokých dávek antibiotik a kortikosteroidů. (3, 15)

2.2.1.2 Virové infekce

Většinou se jedná o důsledek infekce jiných orgánů a tkání. Původci onemocnění jsou většinou enteroviry, herpetické viry nebo virus klíšťové meningoencefalitidy. (3, 15)

Už v iniciální fázi virové infekce lze detekovat aktivované monocyty a lymfocyty. Jde tedy o mononukleární pleiocytózu. Neutrofilní granulocyty jsou také přítomny zejména v počáteční fázi a v průběhu onemocnění jejich počet klesá. Biochemickými parametry se od bakteriální infekce liší zejména nižší hladinou laktátu, celkové bílkoviny a hladinou glukózy vyšší než 50% glykémie. (5, 11, 15)

3 VYŠETŘENÍ MOZKOMÍŠNÍHO MOKU

Vyšetření se rozděluje na část fyzikální (tlak v likvorových cestách, vzhled), biochemickou a cytologickou.

3.1 Tlak v likvorových cestách

U většiny zdravých jedinců je sekrece a reabsorpce v rovnováze a tlak je menší než 150 mm H₂O. Měří se manometrem u ležícího pacienta. Poloha, stupeň relaxace pacienta a zručnost lékaře, který zákrok provádí, může mít na měření tlaku značný vliv. Když tlak vytékajícího likvoru vzroste, může být příčina v infekčním nebo neinfekčním onemocnění. Rychlé zvýšení tlaku může být způsobeno akutní infekcí, např. meningitidou. (5)

3.2 Vzhled

Hodnocení vzhledu se provádí před centrifugací a po centrifugaci. Za fyziologických okolností je likvor u dospělého člověka čirá, bezbarvá tekutina. Změnu barvy způsobuje mj. hnisavý zánět, kdy je likvor žlutý, popř. žlutozelený a zakalený. Při příměsi krve je likvor erytrochromní nebo sangvinolentní a nabývá narůžovělého až červeného zabarvení. Krev v likvoru může být přítomna i v důsledku poranění žilních pletení při punkci a patří mezi nejčastější příčiny krevní příměsi. U takového krvácení se postupně likvor vyčeří a supernatant je po centrifugaci bezbarvý. Kanárkově žlutý vzhled je známkou přítomnosti bilirubinu. Takový likvor se označuje jako xantochromní. Fyziologicky zvýšený bilirubin se nachází u novorozenců díky nezralosti BBB. Zvýšená hladina bilirubinu může přetrvávat 3–4 týdny po krvácení do likvorových cest, popř. může dojít k přestupu bilirubinu ze séra při těžkém ikteru. Methemoglobin (hemoglobin, který obsahuje Fe³⁺ místo Fe²⁺) způsobuje tmavě žluté až hnědé zabarvení a je nálezem relativně vzácným. (7, 12)

Zakalený likvor může být kromě hnisavého zánětu i známkou kontaminace. V tomto případě lze zákal odstranit centrifugací. (9)

3.3 Biochemické vyšetření likvoru

3.3.1 Proteinorachie

Hladina celkové bílkoviny (dále jen CB) v likvoru je přibližně 200krát nižší než v plazmě. Je z 80% sérového původu a zbylých 20% je mozkového původu. Koncentrace CB v likvoru závisí na molekulové hmotnosti, náboji, sérové koncentraci a na funkčním stavu BBB.

Fyziologické rozmezí u dospělého člověka je 0,15–0,40 g/l a s věkem stoupá. Novorozenci mají koncentraci CB vyšší z důvodu nedostatečně zralé BBB (0,40–0,80 g/l). Zvýšená koncentrace CB se označuje jako hyperproteinorachie. Tento stav nastává nejčastěji při porušení BBB, při poškození buněk CNS v případě zvýšení strukturních proteinů, při aktivaci imunitního systému a při nádorovém bujení. Zvýšenou hladinu může způsobovat také arteficiální krvácení, které je nutno zohlednit při hodnocení CB. Korekce se provádí tak, že se od naměřené koncentrace odečte 10 mg/l na každých 1000 erytrocytů v 1 μ l. Bakteriální zánět může způsobit zvýšení koncentrace CB až na 20 g/l a kompresivní syndrom až na 40 g/l. (12)

3.3.2 Glykorachie

Jako glykorachie se označuje koncentrace glukózy v likvoru. Hlavní energetický zdroj pro nervové buňky je glukóza. Hodnota glykorachie závisí na glykémii, nabývá 60% sérových hodnot. Transport glukózy přes transportní systém je limitována hodnotou sérové glukózy 38 mmol/l. V tomto okamžiku je transportní systém plně saturován a glykorachie se již nezvyšuje. (23, 12)

Fyziologické hodnoty se nachází v rozmezí 2,5–3,9 mmol/l. U novorozenců 1,6–4,3 mmol/l. Hypoglykorachie je označení pro nízkou hladinu glukózy v likvoru. Hladina glukózy se snižuje, protože je při hnisavém zánětu spotřebovávána zejména neutrofilními granulocyty. Klinický význam má nejen glykorachie, ale též poměr glykorachie a glykémie. Je-li tento poměr $< 0,4$ (u novorozenců $< 0,8$), je relativně vysoká pravděpodobnost přítomnosti bakteriální meningitidy. (23, 24, 5, 12)

Mezi další příčiny snížené hladiny glukózy v likvoru patří mozkové neoplazie (glukóza je využita jako zdroj energie pro nádorové buňky), subarachnoideální krvácení

a mozková ischemie. Stanovení glykorachie je vhodné provést v co nejkratší době od odběru. (23, 24, 5, 12)

3.3.3 Laktát

Laktát neprochází přes hematoencefalickou bariéru, a proto není závislý na jeho plazmatické koncentraci. Tvoří se při anaerobní glykolýze, fyziologicky je tato produkce v rozmezí 1,2–2,1 mmol/l. (12, 23)

Klinický význam má zvýšená hladina laktátu. Slouží zejména jako pomocné kritérium k odlišení bakteriální a virové meningitidy. Při bakteriální meningitidě je laktát několikanásobně vyšší než při virové infekci. (12, 23)

3.3.4 Chloridy

Chloridy nahrazují ve sloupci aniontů bílkoviny, takže v likvoru je jejich hodnota vyšší než v plazmě. Klinický význam má nižší hladina chloridů, která pomáhá zhodnotit velikost poškození hematoencefalické bariéry, např. u tuberkulózní meningitidy. (5, 12, 23)

Fyziologické rozmezí je 120–132 mmol/l. V současné době se upouští od jejich stanovení. (12)

3.3.5 Ostatní biochemická vyšetření

3.3.5.1 Spektrofotometrie

Tato metoda patří mezi speciální vyšetření a je asi desetkrát citlivější než lidské oko a uplatňuje se při podezření na krvácení do subarachnoideálního prostoru. Likvor k tomuto stanovení musí být co nejdříve od odběru odstředěn. Při spektrofotometrickém vyšetření je hodnocena přítomnost oxyhemoglobinu, bilirubinu, popř. methemoglobinu na spektrofotometrické křivce nativního likvoru (resp. supernatantu) získané při 350–700 nm dle posledních doporučení. (5, 10, 23)

3.3.5.2 Elektroforéza

Z důvodů nízké hladiny proteinorachie se musí likvor před tímto stanovením šetrně upravit, a to zahuštěním nebo obarvením bílkovinných frakcí. Od elektroforézy se v současné době upouští. (12)

3.3.5.3 Izoelektrická fokusace bílkovin

Slouží k průkazu oligoklonálních proužků Imunoglobulinu G. IgG přecházejí do likvoru ze séra při poruše BBB. Dělení probíhá v elektrickém poli v gradientu pH podle izoelektrického bodu jednotlivých bílkovin. Při vyšetření likvoru touto metodou se současně provádí vyšetření séra a sleduje se zejména přítomnost oligoklonálních proužků v likvoru, které v séru chybí. (15, 24, 12)

3.4 Cytologické vyšetření likvoru

Cytologie likvoru zkoumá počet a morfologii přítomných buněk. Slouží k rozlišení serózního a purulentního zánětu, popř. k průkazu a identifikaci bakterií. (8, 12)

3.4.1 Cytologie kvantitativní

Pomocí tohoto vyšetření se zjišťuje počet buněk ve známém objemu. Stanovuje se ve Fuchs–Rosenthalově komůrce o objemu 3,2 μl a k obarvení jaderných elementů slouží kyselý fuchsin nebo jiné barvivo zvýrazňující jaderné struktury. Diferenciace jaderných elementů tímto způsobem na mononukleáry a polynukleáry je ale málo spolehlivá. Erytrocyty se počítají v nativním likvoru. (12, 15, 18)

I při normálním počtu buněk může být jejich složení patologické. Proto se doporučuje ve všech případech zhotovit preparát pro kvalitativní vyšetření alespoň v základním barvení. (12, 15, 18)

3.4.1.1 Vyjadřování počtu elementů

- $n_{\text{částice}}/3\mu\text{l}$ – tento způsob vyjadřování je dodnes používán.
 - $n_{\text{částice}}/\mu\text{l}$ – počet elementů je dělen třemi, tento způsob vyjadřování počtu elementů je používán v mé bakalářské práci.
 - $n_{\text{částice}}/\text{l}$ – počet částic na jeden litr. Ačkoliv se v likvorologii tento způsob zatím moc nepoužívá, je uzákoněn a postupně se bude na toto vyjadřování přecházet.
- (1)

3.4.2 Cytologie kvalitativní

Tímto vyšetřením se zjišťuje zastoupení jednotlivých buněčných elementů a hodnotí se jejich morfologie. Buňky jsou v některých případech v likvoru v nízkém počtu a

proto je potřeba je šetrně zkoncentrovat. K tomuto účelu slouží cytosedimentace nebo cytocentrifugace. Základní barvicí metoda pro toto vyšetření je barvení dle Pappenheima.

Při podezření na přítomnost bakterií se zhotovuje nátěr ze sedimentu a pro rychlé určení se zvolí barvení dle Gramma. Ostatní typy barvení se používají podle předpokládané diagnózy. Při podezření na lipofagocytózu se používá barvení na lipidy pomocí sudanové černě B nebo olejové červeně. Barvení toluidinovou modří přispívá k detekci vysoce aktivovaných elementů nebo maligních buněk. K průkazu přítomnosti železa se využívá PAS reakce. (8, 14)

Dnes je možná identifikace buněk v likvoru pomocí imunochemických metod, které se běžně používají při vyšetření leukocytů v periferní krvi a kostní dřeni. Kvalitní cytologický preparát lze připravit jen z živých, neporušených buněk. Jako první podléhají cytolýze granulocyty a nádorové buňky. Životnost buněk lze prodloužit o několik hodin uchováním vzorku při 4°C. (8)

4 CYTOLOGICKÉ NÁLEZY V MOZKOMÍŠNÍM MOKU

4.1 Fyziologický nález

Fyziologicky se nachází v likvoru u dospělého člověka pouze mononukleáry (větší část tvoří lymfocyty). Převažují klidové elementy, aktivováno může být maximálně 10% elementů. Cytologická norma připouští u dospělého do 5 buněk v 1 μ l a u novorozenců do 10 buněk v 1 μ l. Ojediněle se mohou vyskytovat také buňky výstelky likvorových cest. (5, 12, 24)

Při artificiální příměsi krve při odběru likvoru nacházíme erytrocyty i segmenty. (12, 24)

4.2 Patologický nález

Jako patologický nález se označuje přítomnost erytrocytů, segmentů, větší zastoupení aktivovaných lymfocytů, přítomnost plazmocytů, fagocytů, vyšší počet buněk výstelky likvorových cest a nález nádorových buněk. Přítomnost erytrocytů a segmentů je přípustná pouze při arteficiálním krvácení při odběru. V přítomnosti většího množství erytrocytů při arteficiálním krvácení, je nutné provést korekci. Počet leukocytů se sníží o 1–2 na 1000 erytrocytů. (9, 12, 24)

4.2.1 Syndromologická klasifikace likvorových cytologických nálezů

Oligocytóza je termín užívaný pro počet buněk do 10/3 ve Fuchs – Rosenthalově komůrce, zatímco pleocytóza označuje vyšší počet buněk. Podle buněčného složení lze formulovat oligocelulární či pleocytární likvor do jednotlivých cytologických syndromů. Každý z následujících syndromů má jednu převažující složku, ale při různých patologiích mohou nastat i různé kombinace těchto syndromů. (9, 5)

4.2.1.1 Oligocytóza

a) Granulocytární

Tvoří ji z velké části neutrofilní granulocyty např. při nehnisavém zánětu a mozkové ischemii. Přítomnost eozinofilních granulocytů značí např. alergickou reakci. (9, 15, 16)

b) *Lymfocytární*

Zde je přítomnost aktivovaných lymfocytů a plazmatických buněk. Tento nález je častý při roztroušené skleróze a při chronických neuroinfekcích. (9, 15, 16)

c) *Monocytární*

U tohoto syndromu je převaha aktivovaných monocytů. Takto aktivované monocyty – fagocyty se hůře rozpoznávají.

Přítomnost monocytů je detekována v terminálních fázích neuroinfekcí. Dále ji lze pozorovat u polyradikulonefritidy Guillain – Barré. (9, 15, 16)

d) *Tumorózní*

Zde jsou přítomny maligní buňky pocházející z nádorů, které se nachází v blízkosti likvorových cest, nebo se jedná o maligní infiltraci.

(9, 15, 16)

4.2.1.2 Pleocytóza

a) *Granulocytární s převahou neutrofilních granulocytů*

Počet neutrofilních granulocytů je zvýšen nad $5/\mu\text{l}$, někdy až na tisíce a desetitisíce. Nejčastější výskyt je při bakteriální meningitidě. (9, 15, 16)

b) *Granulocytární s převahou eozinofilních granulocytů*

Jedná se o méně častý nález – tzv. obraz eozinofilní meningitidy. Nejedná se o zánětlivé onemocnění, ale o projev závažné alergické reakce, parazitární, mykotické nebo autoagresivní onemocnění. (9, 15, 13)

c) *Lymfocytární*

U tohoto typu pleocytózy se nachází vysoký počet lymfocytů a jejich aktivovaných forem. Tento nález provází nehnisavá zánětlivá onemocnění jako je virová meningitida a spirochetální infekce. (9, 23)

d) *Monocytární*

Monocyty zde většinou jeví známky aktivace – nespecifický znak pro přítomnost neinfekčního onemocnění. Aktivovaný monocyty – makrofág zprostředkovává fagocytózu. Podle specifického substrátu lze makrofágy dále klasifikovat. Erytrofágy značí čerstvé intermeningeální krvácení, siderofágy starší krvácení, leukofágy značí přítomnost hnisavého zánětu a lymfocytární nehnisavého zánětu. Lipofágy se vyskytují např. při degenerativním onemocnění CNS. (5, 9, 15, 16, 23)

e) *Tumorózní pleiocytóza*

Výskyt vyššího počtu maligních elementů společně s jejich fagocytovanou formou. (9, 15, 16)

5 PREANALYTICKÁ ČÁST LABORATORNÍHO VYŠETŘENÍ

Správnost výsledků laboratorního vyšetření je ovlivněna mnoha faktory. Tyto faktory se rozdělují na preanalytické, analytické a postanalytické. Chyby v preanalytické fázi tvoří značnou část všech laboratorních chyb. (19)

Preanalytická fáze laboratorního vyšetření zahrnuje mnoho vlivů a procesů, které se významným způsobem podílí na konečném výsledku stanovení ještě před tím, než se vzorek dostane do laboratoře. Preanalytická část zahrnuje postupy a operace od indikace vyšetření až po zahájení analýzy vzorku. (4, 15, 19)

Mezi hlavní preanalytické vlivy patří příprava pacienta na odběr vzorku, odběr biologického materiálu, uchování a případný transport materiálu do laboratoře. Další vlivy jsou biologické - ovlivnitelné, či neovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné biologické preanalytické vlivy, ve vztahu k vyšetření likvoru, patří zejména věk pacienta. (4)

5.1 Odběr materiálu

Před odběrem biologického materiálu musí být odběrová nádoba jasně označena, aby nedošlo k záměně vzorků. Likvor odebírá lékař do sterilní zkumavky bez aditiv, s umělohmotnou nebo gumovou zátkou. (10)

K hodnocení hematoencefalické bariéry a intrathekální syntézy imunoglobulinů je třeba zaslat do laboratoře současně žilní krev bez protisrážlivých prostředků. Krev na stanovení koncentrace glukózy se odebírá do zkumavky s protisrážlivým a antiglykolytickým prostředkem. Krev má být odebrána přibližně 30 minut před odběrem likvoru. (15, 4)

5.2 Transport materiálu

Je nutné, aby byl biologický materiál dopraven s řádně vyplněnou žádankou, aby identifikační údaje na odběrové nádobě souhlasily s identifikačními údaji na žádance. (10)

Transport likvoru probíhá zásadně při laboratorní teplotě. Spolu s krví je vhodné likvor transportovat v obalech, které jsou pro tuto činnost určeny. Obaly chrání biologický materiál před výkyvy teploty, světlem a mechanickými otřesy. (11, 10)

5.3 Preanalytická fáze v laboratoři

Při příjmu vzorku do laboratoře proběhne kontrola identifikačních údajů, zadání požadavků do laboratorního informačního systému a označení zkumavek čárovým kódem. (4, 10)

5.4 Požadavky ke zpracování

Nativní a centrifugovaný likvor je nutné zpracovat do jedné, maximálně do dvou hodin od odběru ke kvantitativní i kvalitativní cytologii. K biochemickému zpracování, je možné po stejnou dobu použít likvor centrifugovaný. Ke spektrofotometrickému vyšetření je nutné centrifugovat likvor nejdéle do jedné hodiny do odběru. Pokud není provedeno vyšetření ihned, musí být supernatant skladován v temnu při teplotě 4°C. (4, 10)

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL A HYPOTÉZY

6.1 Cíl

V průběhu plnění praktické části bakalářské práce chci zjistit, zda se budou měnit počty sledovaných buněčných elementů po porušení preanalytické části laboratorního vyšetření.

Pro dosažení tohoto cíle je nutno splnit následující předpoklady:

1. Sběr dostatečného množství kvalitních vzorků likvoru.
2. Nastudovat vzhled buněčných elementů pro jejich následnou diferenciaci.

6.2 Hypotézy

Erytrocyty a leukocyty potřebují ke svému metabolismu glukózu jako zdroj energie. Z krve ji přijímají pomocí přenašečů na svém povrchu. Když se erytrocyty a leukocyty nachází v odebraném vzorku likvoru, kde je dostatek glukózy, mohou ji po nějakou dobu čerpat a jejich počet by se neměl měnit.

Pokud vykazuje likvor známky zánětlivého bakteriálního onemocnění, tak by se měly erytrocyty a leukocyty rozpadat rychleji, protože glukózu čerpají jako zdroj energie i přítomné bakterie. Současně není zánětlivý mozkomíšní mok pro buněčné elementy přirozené prostředí. Po delším stání vzorku při laboratorní teplotě by se tedy mohlo stát, že počet erytrocytů a leukocytů bude falešně snížený.

Počet erytrocytů by se mohl měnit i v závislosti na osmolalitě prostředí. Likvor je za fyziologických podmínek isoosmolární – pro erytrocyty je takové prostředí přirozené. Pokud ale nastane změna ve složení likvoru, může se změnit i jeho osmolalita. Hypoosmolární prostředí by způsobilo snížení počtu erytrocytů v důsledku nasávání vody z okolí a jejich následnou lýzu. Naopak hyperosmolární prostředí, by způsobilo svrašťování a deformaci buněk. Takové erytrocyty by se v nativním likvoru hůře rozpoznávaly a byly by snadněji zaměnitelné s jinými buněčnými elementy.

7 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A POMŮCKY

7.1 Binokulární mikroskop Olympus BX41

Tento optický mikroskop se skládá z mechanické, optické a osvětlovací části. Základními prvky optické části jsou objektiv a okulár – soustava spojených čoček. Pomocí objektivu se pozorovaný objekt zobrazuje jako zvětšený, skutečný a převrácený. Okulár zajišťuje, že je pozorovaný objekt převrácený, zvětšený a neskutečný. (6, 14)

Popis mikroskopu:

Obrázek číslo 1. *Mikroskop Olympus BX41*



Zdroj: vlastní foto pořízené ve FN Plzeň na ÚKBH

Legenda: 1...okulár, 2...tubus, 3...objektivy, 4...stolek, 5...makrošroub, 6...mikrošroub, 7...zdroj světla

Postup při mikroskopování: (6, 14)

1. Spínačem jsem zapnula osvětlení.
2. Na stolek jsem umístila Fuchs–Rosenthalovu komůrku, která musí být zajištěna svorkami.
3. Nastavila jsem si objektiv na požadované zvětšení – konečné zvětšení vzorku bylo 200x, popř. 400x.
4. Pomocí makrošroubu jsem přiblížila objektiv co nejbližší ke komůrce.
5. Zorné pole jsem doostříla jemným posunem pomocí mikrošroubu.
6. Za použití vodičů jsem posouvala stolek s komůrkou dle potřeby.

7.2 Pipety a špičky

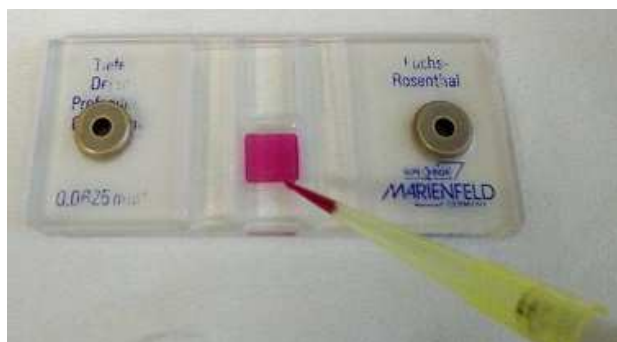
Pro stanovení byly použity kalibrované pístové pipety značky Eppendorf. Pístové pipety jsou velmi přesné, bezpečné a barevně odlišitelné podle objemu. Součástí pipet je mechanismus na odhazování špičky. (6)

Špičky jsou jednorázové a jsou vyrobeny z polypropylenu.

7.3 Fuchs–Rosenthalova komůrka

Fuchs-Rosenthalova komůrka má objem 3,2 μl a rozděluje se trojitými čarami na 16 velkých a 256 malých čtverců.

Obrázek číslo 2. *Fuchs–Rosenthalova komůrka s obarveným likvorem*



Zdroj: vlastní foto pořízené ve FN Plzeň v ÚKBH

7.4 Barvicí roztok

Pro obarvení jaderných elementů a lýzu erytrocytů bylo vhodné použít Samsonův roztok. (17)

Složení Samsonova roztoku:

- ledová kyselina octová...90 ml
- fenol...6 ml
- přesycený kyselý fuchsin...6 ml

8 PRACOVNÍ POSTUP

1. Opatrným převrácením zkumavky jsem promíchala zkumavku s likvorem.
2. Do čisté zkumavky jsem napipetovala 100 μ l likvoru a 10 μ l připraveného Samsonova roztoku.
3. Inkubace trvala 10 minut při laboratorní teplotě.
4. Pod krycí skličko na Fuchs–Rosenthalově komůrce jsem napipetovala do jedné poloviny dočasný obarvený likvor a do druhé poloviny likvor nativní.
5. Buněčné elementy jsem pozorovala při 200násobném zvětšení:
 - Erytrocyty – v nativním likvoru
 - Jaderné elementy – v obarveném likvoru
6. Po odečtu výsledku jsem komůrku důkladně umyla, osušila, vyleštila a uložila do obalu.

Celý postup jsem provedla ihned po přijetí vzorku do laboratoře a následně po 1,5 hodině a 3 hodinách, kdy byl likvor ponechán při laboratorní teplotě.

8.1 Vlastní počítání ve Fuchs–Rosenthalově komůrce

Erytrocyty v nativním preparátu a jaderné elementy v barevném preparátu se počítají v 256 čtverečcích. Pokud bylo obtížné spočítat buněčné elementy ve všech čtverečcích, bylo možné spočítat pouze např. 5 čtverečků. Z 5 libovolných čtverečků se spočítal průměr, který se vynásobil 256. Tento postup jsem zvolila v případě, že počet buněčných elementů byl velmi vysoký a počítání všech čtverečků by bylo časově náročné.

$$\emptyset \cdot 256 = c$$

\emptyset ...průměr z pěti čtverečků,

c...vypočtený počet buněk

Další způsob počítání buněk ve Fuchs–Rosenthalově komůrce je počítání po úhlopříčce:

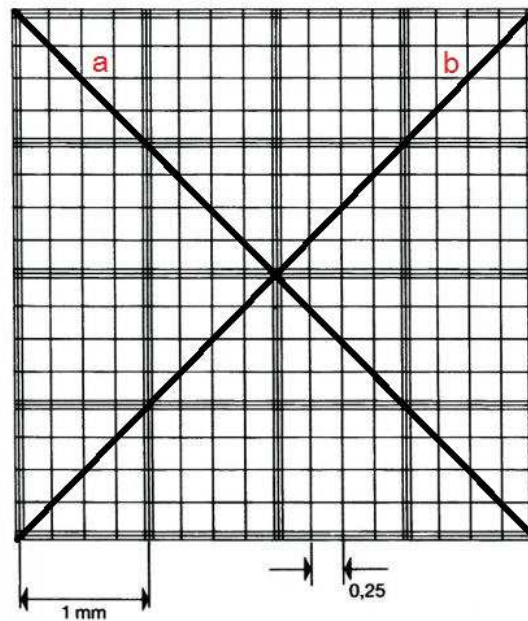
$$\frac{a+b}{2} \cdot 16 = c$$

a...úhlopříčka vedená ve Fuchs–Rosenthalově komůrce z levého horního rohu do
pravého dolního rohu

b...úhlopříčka z pravého horného rohu do levého dolního rohu

c...vypočtený počet buněk

Obrázek číslo 3. *Schéma Fuchs –Rosenthalovy komůrky*



Zdroj: <http://www.bdl-cee.com/komurka-pocitaci-fuchs-rosenthal>

Pokud bylo i tak počítání obtížné, nebo se buňky překrývaly, bylo nutné likvor
naředit. Ředění se provádělo fyziologickým roztokem – 0,9% NaCl. Počet buněčných
elementů se pak vynásobil číslem ředění.

9 SLEDOVANÉ BUNĚČNÉ SPEKTRUM

Pro splnění účelu této bakalářské práce jsem se naučila rozeznávat erythrocyty v nativním preparátu a leukocyty v dočasném barveném preparátu. Prováděla jsem diferenciaci leukocytů na polynukleáry a mononukleáry.

Erythrocyty jsou bezjaderné, bikonkávní buňky. Velikost erythrocytu je v průměru 7x2 μm . Jsou velmi citlivé na změny osmotického tlaku. Pokud se osmotický tlak sníží, tak erythrocyt přijímá vodu z okolí, jeho objem se zvětšuje a může dojít k jeho prasknutí. V opačném případě vodu odevzdává do okolí a srašťuje se. (7, 14)

Hlavní pozornost při počítání erythrocytů jsem musela věnovat typickému centrálnímu projasnění. Erythrocyty jsou snadno zaměnitelné s leukocyty podobné velikosti. Proto je nutné při mikroskopování stále proostřovat preparát a hledat buňky bez jader, s čistým projasněním.

Díky barvení Samsonovým roztokem dojde k rozpadu erythrocytů, takže v barveném preparátu zůstanou polynukleáry a mononukleáry. Pro správné rozdělení buněk je potřeba rozlišovat jejich velikost, tvar a velikost jádra a množství cytoplazmy. (14, 23)

Mononukleáry se rozdělují na lymfocyty a monocyty. Lymfocyty můžeme dále rozdělit na T-lymfocyty a B-lymfocyty, které však nelze okem rozpoznat. (14, 23)

Klidové lymfocyty, o velikosti 8–10 μm , mají veliké jádro, které vyplňuje buňku tak, že cytoplazma představuje pouze úzký lem kolem něj. Aktivovaný lymfocyt je buňka o velikosti 11–18 μm . Největší lymfoidní buňkou je plazmocyt. Vyvíjí se z B-lymfocytu (konečné stádium) a je veliký 21 μm . (14, 23)

Monocyty jsou velké jaderné buňky o velikosti 15–30 μm . Jádro má nepravidelný tvar a bývá laločnaté. Cytoplazma se barví světleji než u lymfocytů. Aktivovaný monocyt se od klidového liší velikostí a přítomností vakuolizace. (14, 23)

Polynukleáry se rozdělují na neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulocyty. Odlišují se velikostí, tvarem jádra a granulací cytoplazmy. Neutrofilní granulocyty jsou veliké průměrně 10–14 μm . Ve zralém stádiu se jejich jádro rozděluje na 3–5 segmentů a cytoplazma obsahuje vyzrálá granula. Eozinofilní granulocyty jsou větší a jádro je

rozděleno úzkým můstkem pouze na dva segmenty. Granula jsou cihlově červená. Jádro bazofilního granulocytu je nepravidelné – esovité nebo laločnaté. Granula jsou veliká a temně modrá. (14, 23)

10 SOUBOR PACIENTSKÝCH VZORKŮ

Data byla pořízena ve Fakultní nemocnici v Plzni na Ústavu klinické biochemie a hematologie. Vyšetřován byl každý vzorek bez ohledu na věk a pohlaví pacienta. Jedním z úskalí byl objem odebraného materiálu, který v některých případech nebyl dostačující pro účely mé bakalářské práce, protože cytologické vyšetření muselo být provedeno třikrát. Sběr vhodných vzorků probíhal v období od prosince 2016 do ledna 2017. Z důvodu časové náročnosti a nízkého počtu požadavků na toto vyšetření bylo vyšetřeno pouze 7 vzorků.

Vzorky likvoru jsou označeny čísly od 1 do 7. Čtyři vzorky byly přijaty z oddělení hematoonkologie z indikace sledování rozsahu základního nádorového onemocnění, kdy byla zvýšená pravděpodobnost nálezu nádorových buněk. Cytologické vyšetření likvoru se v těchto případech doplňuje o průtokovou cytometrii, která je založena na počítání buněk impedanční metodou. Ostatní vzorky likvoru byly přijaty z oddělení neurochirurgie, pediatrické kliniky – jednotky intenzivní a resuscitační péče, a neurologické kliniky.

10.1 Cytologické nálezy a kazuistiky

Tabulka 1

Vzorek 1	Počet buněčných elementů v čase [hodiny]			
	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 0 hodin	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 1,5 hodiny	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 3 hodiny	Výsledek laborantky z ÚKBH v čase 0
Erytrocyty	470	565	560	740
Polynukleáry	0	0	0	0
Mononukleáry	12	13	11	17

Zdroj: vlastní zpracování.

Pohlaví pacienta/ky – mužské

Věk – 67 let

Vzorek likvoru číslo 1 byl přijat z hematonekologického oddělení. Lumbální punkce byla indikována z důvodu zjištění stagingu (pokročilosti) základního onemocnění, kterým byl t. č. folikulární lymfom.

Pacient podstoupil léčbu šesti cykly chemoterapie. Po dvou měsících od léčby nastala progrese onemocnění a byla provedena excize zvětšených lymfatických uzlin v pravém třísele. Dle PET MR (magnetická rezonance s pozitronovou emisní tomografií) byla prokázána vysoce metabolicky aktivní lymfomová infiltrace uzlin v oblasti třísel a páteřního kanálu v rozsahu celé bederní páteře a v sakrálním kanálu. Byl aplikován první cyklus chemoterapie. Kontrolní lumbální punkce prokázala infiltraci likvoru při základním onemocnění.

Vzorek likvoru číslo 1 měl fyziologický vzhled – čirý a bezbarvý. Počet mononukleárů byl vyšší než 10/μl takže se jednalo o lymfocytární a monocytární pleiocytózu.

Tabulka 2

Vzorek 2	Počet buněčných elementů v čase [hodiny]			
	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 0 hodin	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 1,5 hodiny	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 3 hodiny	Výsledek laborantky z ÚKBH v čase 0
Erytrocyty	67	63	70	75
Polynukleáry	0	0	0	0
Mononukleáry	2	2	1	2

Zdroj: vlastní zpracování.

Pohlaví pacienta/ky – mužské

Věk – 59 let

Vzorek likvoru číslo 2 byl přijat z oddělení hematonekologie. Stejně jako všechny ostatní vzorky v mé bakalářské práci z tohoto oddělení byl i tento vyšetřován kvůli zjištění stagingu základního onemocnění. Pacient se t. č. léčil z důvodu přítomnosti Non-Hodgkinova lymfomu, takže se primárně sledovala případná přítomnost a počet nádorových buněk v likvoru.

Z důvodu účelu mé bakalářské práce jsem však sledovala pouze počty erytrocytů, polynukleárů a mononukleárů.

Vzhled likvoru byl fyziologický – čirý a bezbarvý. Takto zvýšený počet erytrocytů nemá klinický význam. Množství mononukleárů a polynukleárů bylo v normě. Případná další diagnostika se opírá o vyšetření průtokové cytometrie, kde je případně identifikováno zastoupení suspektních elementů při známé malignitě.

Tabulka 3

Vzorek 3	Počet buněčných elementů v čase [hodiny]			
	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 0 hodin	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 1,5 hodiny	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 3 hodiny	Výsledek laborantky z ÚKBH v čase 0
Erytrocyty	54	52	60	21
Polynukleáry	0	0	0	1
Mononukleáry	3	2	3	1

Zdroj: vlastní zpracování.

Pohlaví pacienta/ky – ženské

Věk – 9 let

Vzorek číslo 3 byl přijat z oddělení dětské hematologie. Pacientka se t. č. léčila s akutní lymfoblastickou leukemií a indikace k tomuto vyšetření byla sledování rozsahu onemocnění.

Vzhled likvoru byl fyziologický – čirý a bezbarvý. Takto zvýšený počet erytrocytů nemá klinický význam. Polynukleáry nebyly přítomny a množství mononukleárů bylo fyziologické.

Tabulka 4

Vzorek 4	Počet buněčných elementů v čase [hodiny]			
Buněčné elementy [$n_{\text{elementů}}/\mu\text{l}$]	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 0 hodin	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 1,5 hodiny	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 3 hodiny	Výsledek laborantky z ÚKBH v čase 0
Erytrocyty	4	3	3	5
Polynukleáry	0	0	0	1
Mononukleáry	0	0	0	1

Zdroj: vlastní zpracování.

Pohlaví pacienta/ky – ženské

Věk – 25 let

Vzorek likvoru číslo 4 byl přijat z hematooonkologického oddělení z důvodu stágingu základního onemocnění, kterým t. č. byla akutní lymfoblastická leukemie. Vyloučení infiltrace nádorovými buňkami musí být kromě cytologického vyšetření potvrzeno i průtokovou cytometrií.

Vzhled likvoru byl fyziologický – čirý a bezbarvý. Takto nízký počet erytrocytů nemá klinický význam.

Tabulka 5

Vzorek 5	Počet buněčných elementů v čase [hodiny]			
Buněčné elementy [$n_{\text{elementů}}/\mu\text{l}$]	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 0 hodin	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 1,5 hodiny	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 3 hodiny	Výsledek laborantky z ÚKBH v čase 0
Erytrocyty	456	373	373	320
Polynukleáry	40107	39538	39253	36693
Mononukleáry	5973	3840	4693	7509

Zdroj: vlastní zpracování.

Pohlaví pacienta/ky – mužské

Věk – 44 let

Vzorek likvoru číslo 5 pocházel z neurochirurgického oddělení. Pacient byl přijat pro polytrauma s kontuzí mozku, hematocefalus a fraktury obratlů. Vyšetření na počítačovém tomografu (CT) ukázalo rozšířený komorový systém. Stav pacienta se postupně horšil. Byla indikována lumbální punkce a cytobiochemické vyšetření mozkomíšního moku, které prokázalo purulentní zánět. Po stále se zhoršující poruše vědomí nastala zástava krevního oběhu. Po opakované nepřímé srdeční masáži došlo k obnovení krevního oběhu, avšak došlo k prohloubení poruchy vědomí do kómatu. Následné CT vyšetření prokázalo lehkou progresi nálezu – jako možná příčina byla uváděna nahromadění hnisu v komorovém systému. Byla zavedena komorová drenáž. Následné CT vyšetření prokázalo prognosticky nepříznivý edém mozku. Nedocházelo ke zlepšení stavu pacienta a byla nutná podpora dechu i oběhu. Po dvou dnech došlo opětovně k zástavě oběhu. I přes veškeré úsilí nebyla obnovena srdeční činnost a pacient zemřel.

Vzhled vzorku číslo 5 byl před centrifugací žlutý a zkalený. Výsledek cytobiochemického vyšetření likvoru prokázal přítomnost purulentního zánětu. Počet mononukleárů a polynukleárů viz Tabulka 5. Neutrofilní granulocyty v trvalém cytologickém preparátu výrazně převažovaly, nález byl označen jako smíšená pleocytóza s převahou neutrofilních granulocytů. Mikrobiologické vyšetření určilo jako původce infekce gramnegativní tyčku - *Enterobacter aerogenes*.

Tabulka 6

Vzorek 6	Počet buněčných elementů v čase [hodiny]			
	$\frac{N_{elementů}}{\mu l}$ za 0 hodin	$\frac{N_{elementů}}{\mu l}$ za 1,5 hodiny	$\frac{N_{elementů}}{\mu l}$ za 3 hodiny	Výsledek laborantky z ÚKBH v čase 0
Erytrocyty	237227	218453	215040	399360
Polynukleáry	36	43	37	4
Mononukleáry	21	21	21	53

Zdroj: vlastní zpracování.

Pohlaví pacienta/ky – mužské

Věk – 5 měsíců

Vyšetření vzorku likvoru číslo 6 bylo indikováno primárně z důvodu vyloučení zánětu. Další možnou diferenciálně diagnostickou rozvahou bylo vzhledem k anamnéze krvácení do likvorových cest.

Pacient byl původně přijat na pediatrickou kliniku pro suspektní subdurální hematom. MR vyšetření popisovalo bilaterální hemisferální subdurální kolekce, které měly charakter subakutního pozdního hematomu. Dále byl popsán rozvíjející se hydrocefalus a oboustranné rozšíření subarachnoideálních prostorů. V důsledku narůstající nitrolební hypertenze byla provedena trepanace a evakuace hematomu. V důsledku recidivujících obtíží byly ve spolupráci s neurochirurgem zavedeny katétry a dle potřeby byla prováděna evakuace. Konečné MR vyšetření prokázalo významnou regresi subdurální kolekce. Pacient byl nadále předán do ambulantní péče.

Likvor měl krvavý a zakalený vzhled před centrifugací. Po centrifugaci byl xantochromní. Proto byl vzorek naředěn fyziologickým roztokem v poměru 1:20 a následně stanoven počet erytrocytů. Barvení a ostatní kroky vyšetření se shodovaly s předchozími stanoveními. Počet leukocytů byl stanoven po obarvení kyselým fuchsinem v neředěném vzorku.

Tabulka 7

Vzorek 7	Počet buněčných elementů v čase [hodiny]			
	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 0 hodin	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 1,5 hodiny	$\frac{N_{\text{elementů}}}{\mu\text{l}}$ za 3 hodiny	Výsledek laborantky z ÚKBH v čase 0
Buněčné elementy [$n_{\text{elementů}}/\mu\text{l}$]				
Erytrocyty	18	13	16	0
Polynukleáry	0	0	0	0
Mononukleáry	4	3	3	3

Zdroj: vlastní zpracování.

Pohlaví pacienta/ky – mužské

Věk – 52 let

Vzorek likvoru byl přijat z neurologického oddělení, kde byl pacient hospitalizován pro přetrvávající závratě trvající cca 2,5 roku.

Vzhled likvoru byl fyziologický – čirý a bezbarvý. Počet polynukleárů byl nulový a počet mononukleárů ve fyziologickém rozmezí. Množství erytrocytů nemá klinický význam.

Dle dalšího vyšetření byla potvrzena přítomnost boreliových IgG protilátek v likvoru i v séru. Vzhledem k nemožnosti vyloučit prodělanou neuroboreliózu a trvající potíže následně přijat na infekční kliniku k ATB léčbě.

DISKUZE

Na spolehlivé zjištění statistické a následně zejména klinické významnosti změny počtu elementů při opožděném provedení kvantitativního cytologického vyšetření mozkomíšního moku by bylo potřeba provést vyšetření více vzorků. Jedná se o obtížný úkol vzhledem k faktu, že mozkomíšní mok je vzácný materiál a současně zahrnuje vzorky jak relativně acelulární, popř. s hraničními počty elementů, tak současně vzorky extrémně buněčné. Zejména vzhledem k rozdílným počtům elementů a současně k rozdílným indikacím cytobiochemického vyšetření jsem se rozhodla provést zhodnocení vzorků částečně odděleně.

Vyšetření vzorku č. 6 z neurochirurgického oddělení bylo provedeno z indikace zjištění případné přítomnosti zejména purulentního zánětu. V tomto případě je třeba posoudit převažující buněčnou složku, kterou ve všech časech byly s jasnou převahou neutrofilní granulocyty. Současně biochemické vyšetření výrazně svědčilo pro obraz purulentního zánětu. Navzdory extrémně vysokému počtu elementů jsme neprokázali, že dochází k rozpadu většího počtu polynukleárů než ostatních složek leukocytární řady, jak uvádí ve své práci R.W. Steele et al. (26) Posouzení počtu erytrocytů v tomto případě nehraje významnější roli, protože jaderné elementy byly významně převažující složkou.

V případě vzorku č. 5 byla indikace provedení cytobiochemického vyšetření ke zjištění přítomnosti zánětu a posouzení případné přítomnosti krvácení. Vzhledem k faktu, že erytrocyty byly významně převažující složkou, je důležité posoudit poměr počtu leukocytů a erytrocytů a provést korekci počtu leukocytů na počet erytrocytů. Tato korekce ve všech případech (v čase 0, za 1,5 a za 3 hodiny) svědčí spíše pro nezvýšený počet elementů. Hodnocení přítomnosti zánětu je v tomto případě však velmi složité a konečné zhodnocení je vždy třeba posuzovat s výsledky mikrobiologického vyšetření. Při posuzování případné přítomnosti krvácení cytologický obraz mohl svědčit pro arteficiální příměs krve či pro velmi čerstvé krvácení (dle zhodnocení trvalého cytologického preparátu nebyly přítomny cytologické známky úklidové reakce po krvácení). Detailnější hodnocení není předmětem mé práce. Počet jaderných elementů v čase 3 hodiny nebyl nižší než v případě prvního stanovení počtu elementů, rozdíl v počtu erytrocytů je vzhledem k vysokému počtu zanedbatelný. Za zmínku stojí, že se

hodnoty cytologických parametrů určených mnou lišily od výsledků stanovených laborantkou. Rozdíl mohl být způsoben např. rozdílným ředěním (mým a laborantky) nutným ke stanovení počtu elementů, popř. rozdílnou zkušeností v provádění kvantitativní části cytologického vyšetření. Pro posouzení rozdílů by bylo vhodné provést porovnání počítání elementů u více vzorků a vždy více pracovníky.

Vzorky 1, 2, 3, 4 a 7 jsem se vzhledem k relativně nízké buněčnosti rozhodla zhodnotit společně. Pouze v případě vzorku č. 1 se jednalo o pleocytózu a i v tomto jediném případě byl počet erytrocytů >500 . V případě vzorků 2, 3, 4 a 7 se jednalo ve všech případech o oligocytózu. Při posouzení změn v jednotlivých časech v čase 0, za 1,5 a za 3 hodiny se v případě vzorků 2, 3 a 4 jedná vždy o oligocytózu, v případě vzorku č. 7 se z hlediska leukocytů jedná o acelulární vzorek. U jediného vzorku č. 1 se jedná o mírnou pleocytózu, kde zjištěný počet elementů je v čase za 1,5 hodiny vyšší než v čase 0 o 1 element/ μl , a následně v čase za 3 hodiny nižší než v čase za 1,5 hodiny o 2 elementy/ μl . Na statistické posouzení změny počtu elementů u likvorů s oligocytózou nebo nevýraznou pleocytózou je třeba většího počtu vzorků. K posouzení klinické významnosti změny by bylo třeba zhotovení a zhodnocení trvalých cytologických preparátů ve všech časových úsecích a současně doplnit vyšetření cytologické o zhodnocení výsledků dalších vyšetření, která se běžně k posouzení v jednotlivých indikacích provádějí (např. provedení analýzy pomocí průtokové cytometrie u likvorů indikovaných k posouzení přítomnosti hematologických malignit), což v praxi není jednoduše proveditelné vzhledem k extrémní náročnosti na množství vzorku.

ZÁVĚR

Cytobiochemické vyšetření mozkomíšního moku patří mezi vyšetření důležitá pro diagnostiku primárních, ale též sekundárních onemocnění nervového systému. Pro správnou interpretaci je důležité dodržení obecně uznávaných preanalytických podmínek. Jejich nedodržení může vést ke špatné interpretaci a mít dopad na diagnostiku a následně terapii pacienta.

Účelem mojí práce bylo zhodnotit případné změny při kvantitativním vyšetření mozkomíšního moku při nedodržení časových preanalytických podmínek vzhledem k faktu, že tato obecně uznávaná doporučení nejsou podpořena odkazy na recentní studie zabývající se touto problematikou v běžném laboratorním provozu.

Výsledek mojí práce dokladuje, že v případě cytologického vyšetření mozkomíšního moku nedochází při opoždění o 1,5, ale ani o 3 hodiny k razantním změnám, které by mohly mít vliv na stanovení koncové diagnózy u vzorků s oligocytózou, ale též u vzorků s výraznou pleocytózou. Nicméně je třeba zdůraznit, že v případě infekčních onemocnění s výrazným cytobiochemickým nálezem sice nemusí mít opožděné provedení cytobiochemického vyšetření dopad na konečnou interpretaci, avšak samotné zdržení diagnostiky může být zdrojem opožděného zahájení adekvátní terapie, což může mít fatální důsledky. V případě nádorových či chronických, autoimunitních procesů zdržení výsledku o 1,5 – 3 hodiny nemá zásadní význam a nemocného akutně neohrožuje na životě též vzhledem k faktu, že diagnostika je v těchto případech založena rovněž na výsledcích dalších vyšetřovacích metod (průtoková cytometrie, bioptické vyšetření, stanovení protilátek, provedení MR či CT vyšetření a další).

Jak vyplývá z mojí práce, zvláštní kapitolou by mohlo být samotné provedení cytologické části cytobiochemického vyšetření, zejména posouzení vlivu lidského faktoru a jeho důsledek na možnou odlišnost konečných výsledků. Stanovení počtu elementů je možno provádět též pomocí přístrojů pracujících na principu stanovení počtu elementů, jak erytrocytů, tak leukocytů, v plné krvi, což sice může eliminovat lidský faktor, avšak v případě mozkomíšního moku je nemálo vzorků s velmi malou buněčností. Nemałym problémem pak může být minimální množství vzorku nutného ke

stanovení počtu elementů, což může být problém zejména u pediatrických pacientů. Zabývání se těmito úskalími však není předmětem mé práce.

Má práce je vhodné východisko k provedení rozsáhlejší studie preanalytické části cytobiochemického vyšetření mozkomíšního moku, která by v ideálním případě měla mít též část zaměřenou na porovnání provádění diferenciací elementů v likvoru více zkušenými pracovníky vzhledem k nutnosti eliminace lidského faktoru.

Závěrem mé práce je možno říci, že nevedla ke spolehlivému potvrzení, že by odložení provedení kvantitativní cytologické části cytobiochemického vyšetření o 1,5, případně o 3 hodiny vedlo ke snížení počtu elementů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Knižní zdroje:

1. ADAM, Pavel. 1995. *Cytologie likvoru..* Pardubice: Stapro. 53 s.
2. AMBLER, Zdeněk. 2011. *Základy neurologie: [učebnice pro lékařské fakulty]*. Praha: Galén. 351s. ISBN 978-80-726-2707-3
3. BARTŮNĚK, P., D. JURÁSKOVÁ, J. HECZKOVÁ a D. NALOS. 2016. *Vybrané kapitoly z intenzivní péče*. Praha: Grada Publishing, 752s. ISBN 978-80-247-4343-1.
4. BUNEŠOVÁ, Martina a Anna SKALICKÁ. 2008. *Pracovní postup - preanalytická fáze laboratorního vyšetření*. Praha: Galén, 44s. ISBN 978-80-7262-574-1.
5. DUNIEWICZ, Milan a Pavel ADAM. 1999. *Neuroinfekce*. Praha: Maxdorf, 309s. ISBN 80-85800-72-1
6. DRECHSLEROVÁ, T., T. PLAČKOVÁ, BEČVÁŘOVÁ I. 2015. *Laboratorní technika*. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, 85s. ISBN 978-80-261-0533-6
7. DYLEVSKÝ, Ivan. 2000. *Somatologie*. Praha: Epava, 480s. ISBN 978-80-86297-05-7
8. GLOSOVÁ, Libuše. 1998. *Cytologický atlas mozkomíšního moku*. Praha: Galén, 95s. ISBN 80-85824-70-1
9. KALA, Miroslav a Jan MAREŠ. 2008. *Lumbální punkce a mozkomíšní mok*. Praha: Galén. 137 s. ISBN 978-80-7262-568-0.
10. MRÁZOVÁ, K. et al. 2017. Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku. *Klinická biochemie a metabolismus*. ISSN: 1210 - 7921
11. PRŮŠA, Richard. 2012. *Průvodce laboratorními nálezy*. Praha: Dr. Josef Raabe, s.r.o., 1740s. ISBN 978-80-87553-68-8.
12. RACEK, Jaroslav, et al. 1999. *Klinická biochemie*. Praha: Galén – Karolinum, 329 s. ISBN 80-7262-023-1.
13. TICHÝ, Jiří. 1998. *Neurologie*. Praha: Karolinum. 340s. ISBN 807184750x.
14. VACEK, Zdeněk. 1995. *Histologie a histologická technika*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-201-9.

15. ZIMA, Tomáš. 2013. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén, 1146 s. ISBN 978-80-7492-062-2

Internetové zdroje:

16. ADAM, Pavel et al. 2009. *Speciální likvorologie: Diagnostické možnosti cytologie mozkomíšního moku, návrh klasifikace cytologických nálezů, klinický přínos a meze používaných metodik* [online]. Publikováno 03/09. [cit. 2017-01-05]. Dostupné z: http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2009/LA0309/likvor.pdf
17. *Atlas klinické biochemie* [online]. Publikováno [cit. 2017-01-06]. Dostupné z: <http://lms.lfp.cuni.cz/mod/glossary/print.php?id=1499&offset=30&sortkey=CREATION&mode=date&hook&lang=en>
18. Oddělení laboratorní medicíny nemocnice Štenberk. *Vyšetření likvoru* [online]. 2013 [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: <http://laborator.nemsne.cz/metody/laboratorni-metody/soubory/likvor.pdf>
19. JINDROVÁ H., M. KAJABOVÁ., R. CALÁBKOVÁ. [online]. Publikováno 2012. [cit. 2017-01-06]. Dostupné z: <http://www.medicinaproxi.cz/pdfs/med/2012/03/11.pdf>
20. LAVRÍKOVÁ, Petra a Fontana Josef. *Likvor, hematoencefalická a hematolikvorová bariéra*. [online]. Publikováno: 2015 [cit. 2016-12-09] Dostupné z: <http://fb.lt.cz/skripta/regulacni-mechanismy-2-nervova-regulace/12-likvor-hematoencefalicka-a-hematolikvorova-bariera/>
21. Mozkomíšní mok. *WikiSkripta* [online]. Publikováno 2008. [cit. 2017-01-05]. ISSN 18046517. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Mozkomíšní_mok&oldid=342846
22. SOBEK, Ondřej, et al. 2012. *Algoritmus vyšetření likvoru v návaznosti na doporučení sekce neuroimunologie a likvorologie české neurologické společnosti JEP*. [online]. Publikováno 2012. [cit. 2017-01-05] Dostupné z: http://www.prolekarniky.cz/ceska-slovenska-neurologie-clanek/algoritmus-vysetreni-likvoru-v-navaznosti-na-doporuceni-sekce-neuroimunologie-a-likvorologie-ceske-neurologicke-37556?confirm_rules=1

23. *Vyšetření likvoru* [online]. [cit. 2017-01-05]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2013/TXOM/um/Vysetreni_likvoru_Cermakova.pdf?lang=en
24. *Vyšetření likvoru a jeho přínos v současné době* [online]. Publikováno 10.1.2002. [cit. 2017-01-05] Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/vysetreni-likvoru-a-jeho-prinos-v-soucasne-dobe-141665>
25. ZEMAN, David. *Vyšetření mozkomíšního moku* [online]. Publikováno: 23.10.2003 [cit. 2016-12-09]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/vysetreni-mozkomisniho-moku-i-cast-157363>
26. STEELE, W. Russel et al. *Leukocyte Survival in Cerebrospinal Fluid* [online]. Publikováno: 5/1986 [cit. 2017-3-25] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC268763/pdf/jcm00106-0183.pdf>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek číslo 1. *Mikroskop Olympus BX41*

Obrázek číslo 2. *Fuchs–Rosenthalova komůrka s obarveným likvorem*

Obrázek číslo 3. *Schéma Fuch –Rosenthalovy komůrky*

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 – Vzorek č. 1

Tabulka č. 2 – Vzorek č. 2

Tabulka č. 3 – Vzorek č. 3

Tabulka č. 4 – Vzorek č. 4

Tabulka č. 5 – Vzorek č. 5

Tabulka č. 6 – Vzorek č. 6

Tabulka č. 7 – vzorek č. 7

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

aj. – a jiné

ATB - antibiotika

BBB – Blood – Brain Barrier (hematoencefalická bariéra)

CB – elková bílkovina

CNS – centrální nervový systém

CT – počítačová tomografie

ELFO – elektroforéza

FN – fakultní nemocnice

H₂O – voda

Hod. – hodina

L₄ – 4. bederní obratel

L₅ – 5. bederní obratel

mj. – mimo jiné

MR – magnetická rezonance

Např. – například

PET MR – magnetická rezonance s pozitronovou emisní tomografií

Popř. – popřípadě

S – křížový obratel

t. č. – toho času

ÚKBH – Ústav klinické biochemie a hematologie